

天麻种子无菌萌发的研究

I、培养的条件与萌发的形态变化

沈栋侠 张恩汉 丁家宜 周锦祥

Studies on the Asymbiotic Germination of Seeds of Tian Ma (*Gastrodia elata* Bl.)

I. The Culture Conditions and the Morphological Changes During Seeds Germination

Shen Dongxia Zhang Enhao Ding Jiayi Zhou Jinxiang

提 要

应用 1/2MS 和 MS 两种浓度的培养基, 对天麻种子进行无菌萌发的试验。经过190天的培养, 前一处理的所有重复都获得了良好结果, 平均萌发率为16.23%, 最高达49.80%; 在 MS 培养基上所播种子则无一萌发。试验结果表明, 人工提供营养物质(包括植物激素等)能使天麻种子萌发, 开创了此项工作研究的一条新途径。本试验中还观察了种子无菌萌发的大致过程和形态变化。此外, 针对天麻种子极其细小的特点, 设计了相当实用的果表消毒法。

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)是高度简化的兰科植物, 没有根和绿叶, 自然条件下不能独立生存, 全赖消化外部侵入的蜜环菌[*Armillaria mellea*(Vahl ex Fr.) Que'l.]菌丝体过异养生活。不但天麻的正常生育与蜜环菌有关, 其种子的萌发也不例外。加之种子体轻形小如尘埃, 以致对它的萌发较难研究。在国外, 日人草野^[1]对“天麻与蜜环菌共生”的关系, 进行过栽培实验, 但对种子萌发他表示“全然无知”。除此, 迄今未见其它报导。国内自60年代开始种子的有菌萌发(Symbiotic germination)研究^[2-5]。周铉首次在种菌混和的自然露地苗床上获得种子萌发率1%的结果^[2,3]。以后中国医学科学院药物研究所等亦得到类似的结果^[4]。

从1975年开始,我们借鉴兰科植物种子无菌萌发成功的先例^[6],着手天麻种子无菌萌发的研究。围绕培养基和培养条件的选择,经过反复实验,终于在今年得到天麻种子无菌萌发的肯定结果和其萌发的大致过程。本文择其要点报导。

一、材料和方法

1. 培养基的配制:基本培养基为MS^[6]。培养基附加成分(毫克/升)有2,4—D1.0、激动素(KT)0.10和水解乳蛋白(LH)3000。蔗糖用量30000,用MS(包括其附加成分)的半量配成1/2MS培养基。两者琼脂用量均为0.5%,PH为5.5—6.0。配制后分装于150毫升三角瓶中,每瓶装入50毫升。在1公斤/厘米²高压下灭菌30分钟。

2. 种子的培育:今年元月室内箱栽自繁箭麻。在3月下旬萌动抽苔(花葶)时,将麻箱移置窗口,接受漫射阳光。5月6日始花。从第一朵花的花冠始裂开始,进行人工授粉。授粉适期为单朵花开花的当天或第二天,过迟则无效。授粉后,子房膨大,果色逐步加深。直至果表出现炒米色小点时,果实上的缝线自行开裂,种子成熟飞散。为利于无菌播种,选择在自行开裂前12—24小时之内的果实(种子),作萌发试验用。

3. 无菌播种与培养:切取即将开裂的熟果,除去残留的花冠。果实经70%的乙醇表面消毒,再放入灭菌培养皿内。消毒的果实常在过夜后自行开裂。这是进行无菌播种的良机。5月29日,在MS和1/2MS培养基上各播种15瓶。播时以戴橡皮手套徒手操作为宜。

播种瓶先放在室温条件下,在炎夏期间转至30℃以下的控温室内,最后移置20—24℃的恒温箱内培养。

4. 种子萌发形态观察:种子萌发40天后,于解剖镜下直接进行萌发统计。每瓶随机取样5点,每点统计100粒。共统计10瓶。又取其中一瓶作萌发和细胞形态的显微观察及照相用。

二、实验结果

1. 不同浓度的MS培养基对天麻种子萌发的效应

通过几年实验摸索与改进,获得了有效萌发,结果详见表1。

表1 无麻种子在不同浓度MS培养基上萌发的效应* (1978)

培养基	培养基附加成分(毫克/升)			无菌播种瓶数	培养天数 (29/V—5/VII)	镜检瓶数	镜检萌发瓶数	镜检平均 萌发率(%)
	2,4—D	激动素(KT)	水解乳蛋白(LH)					
1/2MS	0.5	0.05	1500	15	190	15	15	16.23
MS	1.0	0.10	3000	15	190	10	0	0

* 1/2MS组污染1瓶(已萌发);MS组污染5瓶。萌发率为种子萌发40天的统计数。

从表1看,1/2MS培养基是比较合适的。麻种平均萌发率为16.23%,最高竟达49.80%。而在MS培养基上所播种子,除种胚表现吸胀外,未发现任何一粒有萌发迹象。

2. 无菌萌发过程

镜检表明,天麻种子的胚体属未分化的多细胞之胚,卵形,无胚乳。胚体表层细胞全貌呈龟背花纹状〔图 I—1〕,一般由 7—8 个纵向细胞构成原始茎节。种脐(“咀子”)由一个顶端细胞延伸并联结于种皮的胞壁上;胚根也应在此(近珠孔区域)〔图 I—2〕。胚体无子叶和明显胚芽。但根据种脐反端(近合点区域)来看,有两层排列紧密的较小细胞,具有较强的分裂能力,可能具备胚芽的功能。为了描述方便,暂称为胚芽。

种子吸胀萌动后,种皮从中部胀裂,胚体由此突出,胚体颜色也由原淡褐色变为乳白(胚根部位除外),标志着种子的萌发〔图 II—1,2〕。此时胚根表现衰老退化,仍维持原淡褐色。胚芽不断生长,逐渐形成一个具有多茎节的子麻。我们从少数子麻的原始茎节上发现明显退化的叶痕〔图 II—3〕,从而印证了茎节的存在;也看到原始茎节的各节细胞(胚根除外)都表现有分裂能力:以节处的原始细胞为基础而分裂成细胞“团”,进而产生分枝,形成第一代新生子麻(块茎)。这与块茎类植物各节均可发育一叶和腋芽的规律类似。可以认为天麻种子萌发的胚体是具备了茎节的原始块茎(或称原生块茎)。

以天麻原始块茎为基础,从各茎节上分生出一级分枝形成第一代子麻;又从第一代子麻的茎节上再分生出二级分枝形成第二代子麻,依次类推。原始块茎在供试培养基上分生子代(子麻)的能力极强,而且生长较快。它的分生形态表现多样,但其分生规律尚为一致。从萌动的原始块茎体态变化中看到,块茎变粗在于胚芽细胞的迅速分裂〔图 II—2〕。胚芽在以后又加快伸长,表现出生长极性上的短期顶端优势〔图 III—1,2〕。随着不等数量的第一代或第二代子麻在原始块茎的茎节上(第三茎节以上)出现后,胚芽生长优势即迅速转弱〔图 III—3,4〕、退化甚至消失〔图 III—5,6〕。

三、讨论与结论

过去涉及天麻种子萌发的报告很少。直到 70 年代周铉发表在蜜环菌参予下天麻种子萌发成功的重要报告〔2-3〕。我们的工作着重设计像 1/2MS 这样的选择性培养基,以致取得较上述有菌萌发更好的无菌萌发结果。1/2MS 处理的平均萌发率为 16.23%,而在某些重复中竟高达 30.00% 和 49.80%。试验结果表明人工提供营养物质(包括植物激素等)能使天麻种子萌发,开创了对萌发研究的一条新途径,亦有助于探索天麻和蜜环菌特定关系的本质。当前,天麻生产不断扩大,野生种麻愈来愈少,矛盾日益突出。无菌萌发的成功也为人工生产大量的天麻种麻提供了可能性。在所有 MS 重复中的天麻种子无一萌发。从 MS 和 1/2MS 的营养组成相同和只是分量不同来看,天麻种子在 MS 中的不萌发显然不在于营养物本身的不合需要,很可能是由于前者的渗透压高了,营养物的被利用成了问题。

对于 MS 培养基,试验中只用了“1/2”的和“1”的两种浓度。因此,除“1/2”的浓度以外是否还存在对天麻种子萌发更合适的其它浓度,需要进一步研究明确。

通过镜检发现,天麻种子的萌发过程大致如下:

种 胚 $\xrightarrow{\text{萌动}}$ 原始(生)块茎 $\xrightarrow{\text{萌发}}$ 多级子代(子麻)。子代的生育过程尚待继续培养明确。
(未分化)分化 分生

这样的萌发过程是很特殊的,主要表现在未脱掉种皮之前即已分化出 1—3 代的子麻。关于分生形态的多样表现,我们推测可能是天麻生物学特性的反映。

天麻种子细小、种皮极薄,对它表面消毒和无菌散播在培养基上很难应用常规的消毒法

和无菌操作法。即使勉强作了,污染常常严重,甚至种子也同时受了伤害(在这方面一时尚不能发现)。为此,我们设计了前述的果表消毒法。应用此法的关键在于确切掌握果实成熟和开裂的时期。假如具有超净工作台设备,这种方法的效果则更好。限于天麻在一年只结果一次,靠这种方法来开展天麻的有关研究工作势必受到限制。因此需要继续改进和重新研究新的消毒播种法。

承本院徐国钧教授和南京农学院朱培仁先生审阅并提出宝贵意见。本文在程瑚瑞先生热心指导与修改下完成。魏宝英、于春海(山东省中医药学校进修教师)同志参加部分工作。谨此深致谢意。

参 考 文 献

- [1] Kusano: Jour Coll Agric Tokyo Imp. Univ. 4(1): 1—67, 1911
- [2] 周铨: 植物学报, 16(3), 1974
- [3] 周铨: 中草药通讯, 5, 6, 1973
- [4] 中国医学科学院药物研究所、湖北省利川县国营福宝药材场: 天麻。人民卫生出版社。1973
- [5] 张维径: 植物学杂志, 2, 1978
- [6] 竹内正幸、石原爱也、古谷力: 植物组织培养。朝仓书店。1972

天 麻 种 子 萌 发 过 程

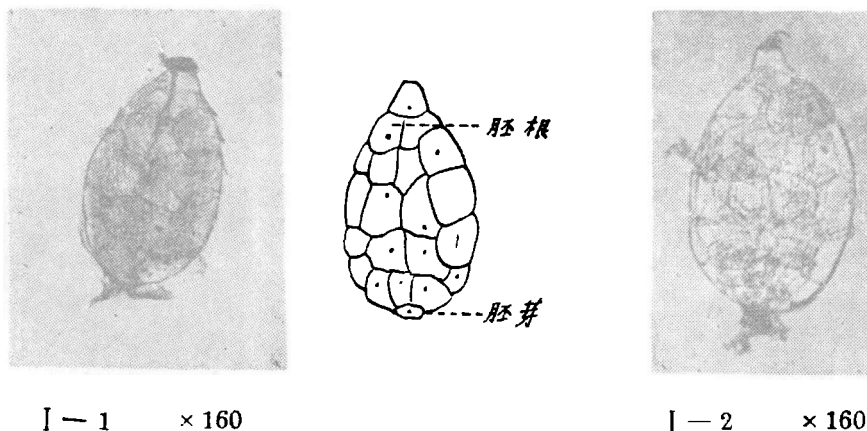
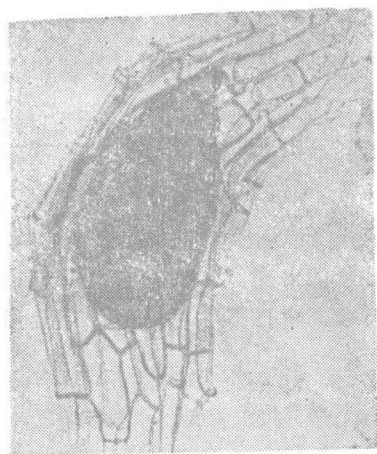
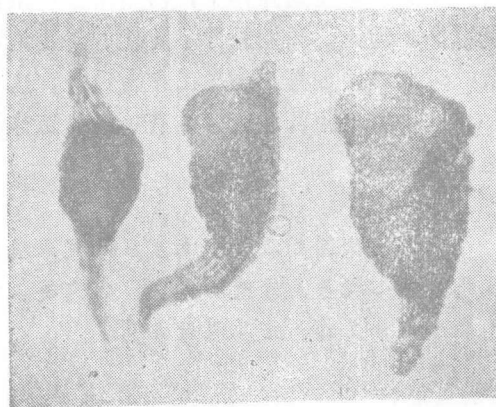


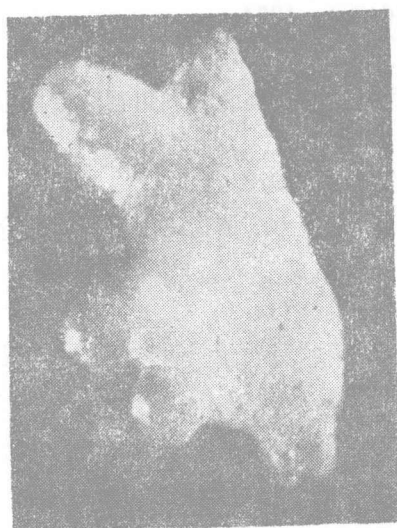
图 I 胚体表层细胞形态



II-1 × 64

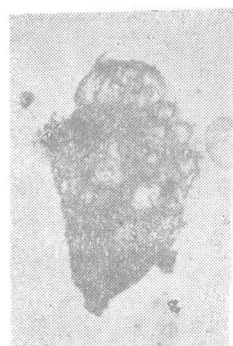


II-2 × 64

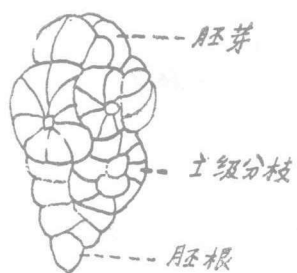


II-3 × 64

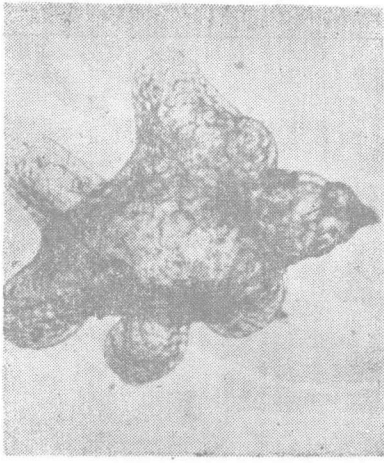
图 II 天麻种子萌发形态



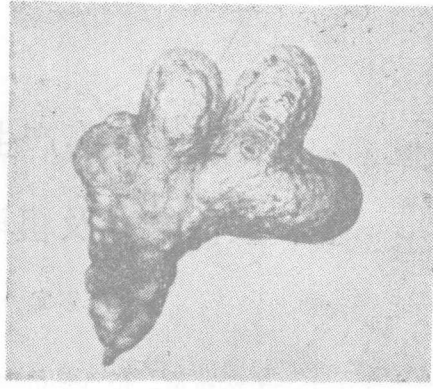
III-1 × 64



III-2 × 64



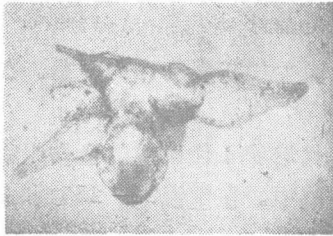
Ⅲ—3 × 64



Ⅲ—4 × 64

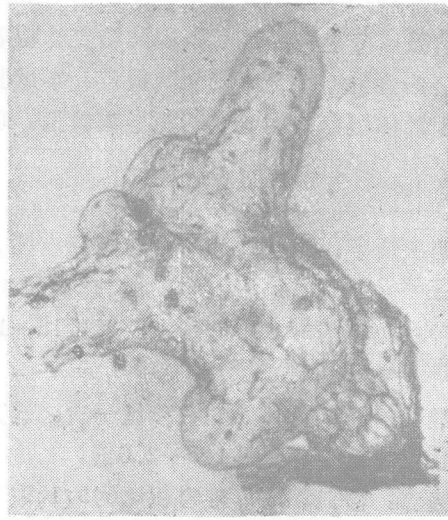


正



反

Ⅲ—5 × 9.6



Ⅲ—6 × 64

注：图中左上角两突起为第一代子麻，
两旁突起为第二代子麻

图Ⅲ 原始块茎的分生形态